

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

23. 1. 2004

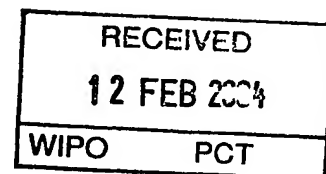
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年12月24日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-371959
[ST. 10/C]: [JP2002-371959]

出 願 人
Applicant(s): 日東紡績株式会社

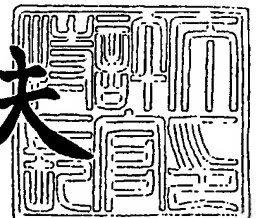


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 DA-03391

【提出日】 平成14年12月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内

【氏名】 野村 文夫

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内

【氏名】 曾川 一幸

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内

【氏名】 朝長 毅

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内

【氏名】 落合 武徳

【発明者】

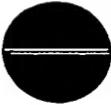
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内

【氏名】 島田 英昭

【発明者】

【住所又は居所】 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡バイオケミカル研究所内

【氏名】 大橋 建也

**【発明者】**

【住所又は居所】 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡メデイ
カル開発センター内

【氏名】 片山 勝博

【特許出願人】

【識別番号】 000003975

【氏名又は名称】 日東紡績株式会社

【代理人】

【識別番号】 100066692

【弁理士】

【氏名又は名称】 浅村 皓

【選任した代理人】

【識別番号】 100072040

【弁理士】

【氏名又は名称】 浅村 肇

【選任した代理人】

【識別番号】 100088926

【弁理士】

【氏名又は名称】 長沼 暉夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100102897

【弁理士】

【氏名又は名称】 池田 幸弘

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002901

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1



【物件名】	要約書 1
【プルーフの要否】	要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 肝臓疾患診断用マーカー蛋白質およびそれを利用した肝臓疾患診断方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトフィブリノーゲン α -E 鎖 (Fibrinogen α -E Chain) の分解産物であって分子量 5,900 の蛋白質 (5.9 kDa 蛋白質)、アポリポ蛋白質 AII (Apolipoprotein AII) の分解産物であって分子量 7,800 の蛋白質 (7.8 kDa 蛋白質)、アポリポ蛋白質 AI (Apolipoprotein AI) であって分子量 28,000 の蛋白質およびこれらの蛋白質の変異体であってこれらと同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有する変異体から選ばれる肝臓疾患診断用マーカー蛋白質。

【請求項2】 5.9 kDa 蛋白質が配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列を有する蛋白質であり、その変異体が該アミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有する蛋白質あるいは配列番号 1 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項 1 の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質。

【請求項3】 7.8 kDa 蛋白質が配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列を有する蛋白質であり、その変異体が該アミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有する蛋白質あるいは配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項 1 または 2 の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質。

【請求項4】 アポリポ蛋白質 AI であって分子量 28,000 の蛋白質が配列表の配列番号 3 のアミノ酸配列を有する蛋白質であり、その変異体が該アミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有する蛋白質あるいは配列番号 3 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項 1 から 3 のいずれかの肝臓疾患診断用マーカー蛋白質。

【請求項5】 肝臓疾患が疑われる患者から得た検体中の、請求項 1 から 4 のいずれかの肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否を検出しあるいはその量を測

定して、肝臓疾患発症可能性、肝臓疾患あるいは肝臓疾患の予後を診断する方法。

【請求項 6】 肝臓疾患が飲酒が要因の肝臓疾患である請求項 5 の診断方法。

【請求項 7】 検体中の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否の検出あるいはその量の測定を質量分析法により行なう請求項 5 または 6 の診断方法。

【請求項 8】 質量分析計で得られるスペクトルのパターン分析により診断する請求項 7 の診断方法。

【請求項 9】 質量分析をレーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (LDI-TOF MS) により行う請求項 7 または 8 の診断方法。

【請求項 10】 レーザーイオン化飛行時間型質量分析計が表面増強レーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (SELDI-TOF MS) である請求項 9 の診断方法。

【請求項 11】 検体中の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否の検出あるいはその量の測定を、該蛋白質に対する抗体を用いた免疫測定法により行う請求項 5 または 6 の診断方法。

【請求項 12】 配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその変異体であって該蛋白質と同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有し且つ該アミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有する蛋白質もしくは配列番号 1 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である変異体。

【請求項 13】 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその変異体であって該蛋白質と同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有し且つ該アミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有する蛋白質もしくは配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である変異体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プロテインチップテクノロジーを利用した血清試料のプロテオーム解析の結果、習慣飲酒に伴って増減し従って肝臓疾患診断用マーカー蛋白質として利用できることが見出された複数の血清蛋白質およびそれらの蛋白質の存否の検出あるいは定量により問題飲酒者等の肝臓疾患発症可能性、肝臓疾患、肝臓疾患の予後等を診断する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

アルコールによる臓器障害の診断の第一歩は正確な飲酒歴の把握であるが、アルコール依存は否認の病気といわれ、常習飲酒家が、その飲酒量を正確に申告しないのは古今東西変わりがない。従って、その裏づけとなる客観的なマーカーが必要である。習慣飲酒のマーカーとして最も広く測定されているのは γ -GTP (GGT) であるが、飲酒家がGGT高値を示す場合でも、その値は肝障害の重症度や積算飲酒量とは必ずしも相関せず、またアルコール飲用後のGGTの変化には個体差があり、大量飲酒後にも増加しないいわゆるノンレスポnderが相当数存在する。

【0003】

一方、飲酒習慣がない場合でも肥満に伴う脂肪肝、ある種の薬剤の常用者など飲酒以外の要因でGGTが上昇する場合も多く、人間ドック等などにおいてGGT高値、即ち飲酒家といった短絡的指導が行われる場合も少なくない。従って、GGTに相補的な検査として糖鎖欠損トランスフェリン (CDT) が北欧の研究者達により開発され、欧米の文献ではその有用性が強調されているが、日本人を対象とした成績では飲酒マーカーとしてのCDTはGGTのノンレスポnderの10%程度を拾いあげるにとどまっている。

【0004】

エタノールの第一代謝産物であるアセトアルデヒドは反応性に富み、種々の蛋白との間で各種のアセトアルデヒド付加体を形成する。例えばアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体をHPLCなどにより検出する試みがなされている。糖尿病におけるHbA1cのように飲酒量を過去にさかのぼって推測しうる興味深いマーカーと期待されるものもあるが、感度に難があり実用化していない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

習慣飲酒は慢性肝障害の2大要因のひとつである。わが国の肝硬変症例において、純粹にアルコールのみに起因する症例の割合は10～15%に過ぎないとされている。しかし、これは主として大学病院などを対象にして得られたデータであり、200万人を超えると予想されるアルコール依存症の存在を考えると、医療機関を受診する機会がないアルコール性肝障害患者が多数潜在していると予想される。また、習慣飲酒は脳出血、高血圧、痛風などの増悪因子でもあり、問題飲酒者を早期にかつ的確にスクリーニングすることは極めて重要である。しかし、上記のように、現在存在するいわゆる飲酒マーカーにおいて感度・特異度において決定的なものはなく、新たなマーカーを検索することが求められている。

網羅的発現タンパク解析の手法として一般的なのは二次元タンパク電気泳動であるが、低分子量蛋白またはペプチドの検出に難がある。近年、surface enhanced laser desorption ionization (SELDI) と飛行型質量分析計を組み合わせたプロテインチップテクノロジーが米国 CIPHERGEN 社により開発され、新規腫瘍マーカーの検出など臨床応用が始まっている。従ってこれらのプロテオミクス技術などを活用して網羅的に新たなマーカーを検索することが求められている。

。

本発明は、問題飲酒者などの肝臓疾患を早期にしかも的確にスクリーニングしうる新規マーカーを見出し、その測定系を確立し、医療に役立てることを課題としている。

【0006】

【問題を解決するための手段】

本発明者らは上記の課題に関して鋭意検討した結果、本発明を完成した。即ち、本発明者らはプロテインチップテクノロジーを応用し、断酒目的に入院したアルコール依存症患者において経時的に採取された血清検体を用い、習慣飲酒に伴って増減する新規の血清蛋白を同定することに成功した。そしてこれらの血清蛋白は肝臓疾患診断マーカー蛋白質として利用できることを見出し本発明を完成させた。

【0007】

従って、本発明は、ヒトフィブリノーゲン α -E 鎖 (Fibrinogen α -E Chain) の分解産物であって分子量 5,900 の蛋白質 (5.9 kDa 蛋白質)、アポリポプロテイン AII (Apolipoprotein AII) の分解産物であって分子量 7,800 の蛋白質 (7.8 kDa 蛋白質)、アポリポプロテイン AI (Apolipoprotein AI) であって分子量 28,000 の蛋白質およびこれらの蛋白質の変異体であってこれらと同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有する変異体から選ばれる肝臓疾患診断用マーカー蛋白質に関するものである。

更に本発明は、肝臓疾患が疑われる患者から得た検体中の、上記肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否を検出しあるいはその量を測定して、肝臓疾患発症可能性、肝臓疾患あるいは肝臓疾患の予後を診断する方法に関するものである。

更に本発明は、配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列を有する新規蛋白質またはその変異体であって該蛋白質と同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有し且つ該アミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有する蛋白質もしくは配列番号 1 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である変異体に関するものである。

更に本発明は、配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列を有する新規蛋白質またはその変異体であって該蛋白質と同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有し且つ該アミノ酸配列と 90% 以上の相同性を有する蛋白質もしくは配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である変異体に関するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下に本発明を更に詳細に説明する。

本発明により肝臓疾患診断用マーカー蛋白質として利用できることが見出された蛋白質は、ヒトフィブリノーゲン α -E 鎖 (Fibrinogen α -E Chain) の分解産物であって分子量 5,900 の蛋白質 (以下 5.9 kDa 蛋白質という)、アポリポプロテイン AII (Apolipoprotein AII) の分解産物であって分子量 7,800 の蛋白質 (以下 7.8 kDa 蛋白質という) およびアポリポプロテイン AI

(Apolipoprotein AI) であって分子量 28,000 の蛋白質 (以下 28 kDa 蛋白質という) である。これらの 5.9 kDa 蛋白質、7.8 kDa 蛋白質および 28 kDa 蛋白質は、それぞれ配列表の配列番号 1、2 および 3 に示すアミノ酸配列を持つ蛋白質である。

【0009】

次にそれぞれの蛋白質を説明する。5.9 kDa 蛋白質はヒト Fibrinogen α -E Chain の分解産物であり、54 個のアミノ酸よりなる蛋白質であって、その理論分子量は 5904.2 である。7.8 kDa 蛋白質はヒトの Apolipoprotein A II 分解産物であり、68 個のアミノ酸よりなる蛋白質であって、その理論分子量は 7753.8 である。また 28 kDa 蛋白質は Apolipoprotein AI であり、243 個のアミノ酸よりなる蛋白質であって、理論分子量 28078.8 である。これら蛋白質の中、5.9 kDa 蛋白質および 7.8 kDa 蛋白質については、その血中の存在、肝障害等における臨床的意義が明らかになったのは本発明が初めてであって、新規蛋白質並びに新規マーカー物質である。また 28 kDa 蛋白質である Apolipoprotein AI は既知の蛋白質であり、脂質代謝における臨床的意義が確立して臨床的に測定されてきたものである。

【0010】

本発明により肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能が見出された 5.9 kDa 蛋白質、7.8 kDa 蛋白質および 28 kDa 蛋白質は、配列表に示したアミノ酸配列を有するもののみに限定されるものではなく、同様に肝臓疾患診断用マーカー蛋白質として機能を有するそれらの蛋白質の変異体であってもよい。即ち、特に血液、組織中では多種類のエンド及びエキソプロテアーゼによって分解を受ける可能性が大きく、アミノ酸の全長や配列の長さに変化があることは十分考慮されるべきである。また組換え蛋白質作製においては発現効率を下げないために抗原性を極力変化させないようなアミノ酸変異を持たせることは定法である。よって本発明の 5.9 kDa 蛋白質、7.8 kDa 蛋白質および 28 kDa 蛋白質のそれぞれのアミノ酸配列と 90% 以上の相同性 (ここで相同性とはアミノ酸の同一性を意味する) を有する蛋白質であるそれらの変異体であってもよい。それらのアミノ酸配列の長さが 15% 以内で変化していても問題はなく、肝臓

疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有する場合は本発明に包含される。そして好ましくは95%以上の相同性を持つ蛋白質、より好ましくは98%以上の相同性を持つ蛋白質がよい。アミノ酸配列の相同性は既に公知のソフトウェア、例えば Wilber, W.J. and Lipman, D.J. らの方法 (Proc. Natl. Sci. USA, 80, 726-730, 1983) に記載の検索方法を原理とするソフトウェアを利用して検索できる。また GENE TYX (ソフトウェア開発株式会社) などは市販される汎用ソフトであって簡単に利用できる。

【0011】

本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質である5.9 kDa蛋白質、7.8 kDa蛋白質および28 kDa蛋白質の変異体としては、配列番号1、2および3のそれぞれのアミノ酸配列において1個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質であって同様の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質としての機能を有する変異体でもよい。このような変異体としては、例えば10%未満のアミノ酸残基が修飾を受けた蛋白質、好ましくは5%未満、更に好ましくは2%未満のアミノ酸残基が修飾を受けた蛋白質などが挙げられる。アミノ酸残基の修飾は、当業者に周知の遺伝子技術によりアミノ酸変異として導入することができる。また翻訳後修飾、リン酸化、アセチル化、糖鎖付加などの周知の修飾を受けた変異体も本発明の範囲に含まれる。

【0012】

以上に説明した本発明により見出された肝臓疾患診断用マーカー蛋白質に基づいて肝臓疾患の診断が可能になる。即ち、肝臓疾患が疑われる患者から得た検体中の、上記肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否を検出しあるいはその量を測定して、肝臓疾患発症可能性、肝臓疾患あるいは肝臓疾患の予後を診断することができる。

本発明で用いることのできる検体としては、肝臓疾患が疑われる患者から採取した血清、血漿、血液、尿などが挙げられる。

本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否の検出あるいはその量の測定は、現在既知のあらゆる方法を採用することができる。例えば、質量分析法、免疫測定法、電気泳動法、液体クロマトグラフィー (LC) 法、ガスクロマトグラフ

ー (GC) 法などが挙げられる。

【0013】

質量分析法としては、レーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (LDI-TOF MS) により行う方法が挙げられる。レーザーイオン化飛行時間型質量分析計としては、表面増強レーザー脱離イオン化 (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) 飛行時間型質量分析計 (SELDI-TOF MS 法)、マトリックス支援レーザーイオン化 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS 法) などを例示できる。

例えば、SELDI-TOF MS 法を用いる場合、CIPHERGEN 社により開発されたプロテイン・バイオロジー・システム II・マス・スペクトロメーター (CIPHERGEN Biosystems, Inc) を使用することができる。この機械は SELDI (surface enhanced laser desorption ionization) と飛行型質量分析計を組み合わせたプロテインチップテクノロジーである。その詳細は WO 01/25791 A2 号公報、特開 2001-281222 号公報等に詳しい。SELDI-TOF MS 法の場合、通常、検体を、前処理した後、チップに吸着させて、SELDI-TOF MS 質量計に付す。検体が血清の場合、アルブミンの吸着剤を用いるか、イオン交換チップでアルブミンが電荷をもたなくなるまでバッファーで洗浄してアルブミンを系から除去することが好ましい。

これらの方法に用いられるプロテインチップとしては、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質を吸着できるチップであれば特に限定しない。例えば、疎水性やイオン交換などの蛋白質に親和性を持つ官能基が修飾されているチップ (ケミカルチップともいう)、目的の蛋白質に対する抗体を固定化したチップ (バイオケミカルチップ) 等を例示できる。

【0014】

その他の質量分析法としては、例えば ESI 法 (Electrospray Ionization) による質量分析法が挙げられる。ESI 法の場合は、プロテアーゼ処理等の前処理した検体を、高速液体クロマトグラフィー等の分離手段と直結した質量分析計に付するのが好ましいことが多い。

免疫測定法としては、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質に対するポリク

ローナル抗体やモノクローナル抗体を作成し、従来知られている蛋白質を測定する方法を挙げることができる。そのような免疫測定法として、酵素免疫測定法（EIA法）、免疫比濁測定法（TIA法）、ラテックス免疫凝集法（LATEX法）、電気化学発光法、蛍光法などを例示することができる。またイムノクロマト法、試験紙を利用した方法も有効である。これらの方法は、いずれも当業者に周知の方法でありこれら周知の方法をそのまま採用することができる。

これらの方法以外にも、電気泳動法、液体クロマトグラフィー（LC）法、ガスクロマトグラフィー（GC）法などが挙げられる。これらの方法も既に当業者に周知であり、それらの周知の方法をそのまま採用することができる。

【0015】

以上に説明した方法により、肝臓疾患が疑われる患者から得た検体中の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の存否を検出しあるいはその量を測定することにより、肝臓疾患発症可能性、肝臓疾患あるいは肝臓疾患の予後を診断することができる。本発明の診断方法は、上記した質量分析により行う場合には、質量分析計によって得られるスペクトルのパターン分析によって診断することもできる。本発明の診断方法は、例えば、習慣飲酒者や問題飲酒者が肝臓疾患を発症する可能性を診断することもでき、飲酒が要因の肝臓疾患、例えば、肝炎、肝硬変などを診断することもでき、また通常の肝臓疾患を診断することもできる。更には、肝臓疾患の治療経過などを診断することもできる。本発明の診断方法は、特にアルコール性肝障害の診断に適している。

【0016】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

実施例 1

SAXII プロテインチップアレイを用いる肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の同定

インフォームド・コンセントを行なった患者血清を使用し、SAXII プロテインチップアレイ（Ciphergen Biosystems, Inc）を用いて血清中の新規肝傷害

マーカーを検索した。SAXIIチップとは Strong Anion Exchange Chip のことであり、検体中の負電荷物質を結合させるという特徴を持っている。検体としてアルコール性肝障害患者入院直後及び禁酒後1週間、3ヶ月そして正常者の血清を用いた。

【0017】

(1) 方法

以下にプロテインチップアレイ実験操作法を簡単に述べる。血清サンプルは8M尿素 (SIGMA) /1%CHAPS (SIGMA) 溶液で10倍に希釈した。10分間氷上処理を行なった後、50mM トリス (SIGMA) 緩衝液 (pH9.0) にて更に10倍希釈し、4,000rpm、5分間の遠心分離操作を行なってその上清を希釈サンプルとして用いた。SAXIIチップは Bioprocessor に取り付けて実験した。Bioprocessor とは金属チップ上に立体的ウェルを簡易作製する穴付プラスチック製アダプターであり、この方法によって希釈サンプルを大量にアプライできる。

初めに150 μ Lの50mM トリス緩衝液 (pH9.0) をウェル状になったチップに加え、振とう機上で5分間洗浄を行なった。これを2回行なった後に先の希釈サンプル100 μ Lを添加し、室温で20分間振とうしてチップと反応させた。続いて希釈サンプルを除き、150 μ Lの50mM トリス緩衝液 (pH9.0) を加えて振とう機上で5分間洗浄を行なった。この操作を3回繰り返した。その後400 μ Lの蒸留水で2回洗浄し、チップを Bioprocessor から取り外した。チップが乾いた後、PAPen (Zymed) で蛋白質の接着しているスポットを囲み、0.5 μ Lの飽和シナピン酸 (Ciphergen Biosystems, Inc) /50%アセトニトリル (Wako) /0.5%TFA (Wako) 溶液を2回添加した。作製したプロテインチップアレイは、プロテイン・バイオロジー・システムII・マス・スペクトロメーター (Ciphergen Biosystems, Inc) によって読み取った。

【0018】

(2) 結果

図1に、代表的なアルコール肝障害入院時患者血清の測定データを示す。このデータフォーマットでは、SAXIIプロテインチップから脱着されたサンプルのタンパク質の分子量を横軸に、その分子量で検出器に到達した分析物の量を反

映するピークを縦軸で表すことができる。よって図1から明らかなように、アルコール性肝障害患者の入院時のデータでは、分子量28 kDaの蛋白質のピークが観察されたが、入院後はほとんど観察されないことが判明した。従って、この28 kDa蛋白質を指標として、肝臓疾患を診断できることが判った。

【0019】

実施例 2

WCXIIプロテインチップアレイを用いる肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の同定

次に実施例1と全く同一検体を使用し、WCXIIプロテインチップアレイ (Ciphergen Biosystems, Inc) を用いて血清中の新規肝傷害マーカーを検索した。WCXIIチップとは Weak Cation Exchange Chip のことであり、検体中の正電荷物質を結合させるという特徴を持っている。

(1) 方法

以下にプロテインチップアレイ実験操作法を簡単に述べるが殆ど実施例1と同様である。血清サンプルを8M尿素 (SIGMA) /1%CHAPS (SIGMA) 溶液で10倍に希釈した。10分間氷上処理を行なった後、50mM 酢酸ナトリウム (SIGMA) 緩衝液 (pH6.5) にて更に10倍希釈し、4,000rpm、5分間の遠心分離操作を行なってその上清を希釈サンプルとして用いた。WCXIIチップは Bioprocessor に取り付け実験し、初めに150 μ Lの50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) をウェル状になったチップに加え、振とう機上で5分間洗浄を行なった。これを2回行なった後に先の希釈サンプル100 μ Lを添加し、室温で20分間振とう反応させた。続いて希釈サンプルを除き、150 μ Lの50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) を加えて振とう機上で5分間洗浄を行なった。この操作を3回繰り返した。その後400 μ Lの蒸留水で2回洗浄し、チップを Bioprocessor から取り外した。チップが乾いた後、PAPen (Zymed) で蛋白質の接着しているスポットを囲み、0.5 μ Lの飽和シナピン酸 (Ciphergen Biosystems, Inc) /50%アセトニトリル (Wako) /0.5%TFA (Wako) 溶液を2回添加した。プロテインチップアレイは、プロテイン・バイオロジー・システムII・マス・スペクトロメーター (Ciphergen Biosystems, Inc) によって読み取った。

【0020】

(2) 結果

図2に代表的なアルコール性肝障害入院時患者血清の測定データ、図3に正常者の測定データを示す。図3から明らかなように、図3の正常者のデータでは、分子量5,900Da (5.9kDa蛋白質)及び分子量7,800 (7.8kDa蛋白質)のピークが大きいにもかかわらず、図2のアルコール性肝障害患者の入院直後のデータでは、ピークがほとんど認められないことが判明した。この5.9kDa蛋白質と7.8kDa蛋白質のピークは治療に従ってピークが高くなり治療効果をよく示している。これらの蛋白質は肝臓疾患診断用マーカー蛋白質となりうることが判った。

【0021】

実施例3

28kDa蛋白質の同定

(1) SAX II プロテインチップ実験によって見出された28kDa蛋白質について FPLC Pharmacia LKB (Amersham Pharmacia Biotech AB) により、HiTrap Qカラムを用いて50mM トリス緩衝液 (pH9.0)、流速2 ml/min条件下で血清サンプルを用いた精製を行なうと目的とする28kDa蛋白質をほぼ単一に精製できた。このフラクションを電気泳動法により次のように確認した。フラクションは SDS を含む2×サンプルバッファー (0.25M Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 20% グリセロール, 0.01% BPB, 10% β -メルカプトエタノール) と1:1の割合で混合し、90℃で2分間処理した後使用した。電気泳動は 15-25%Polyacrylamid Gradient Gel (Perfect NT Gel System Products) を用いて 10mA で行った。

(2) 図4のレーン4および5に示すように、Comassie Tablet R-350 (Phast Gel Blue R) (Amersham Pharmacia Biotech AB) によるクマシーブリリアントブルー染色によって28kDaの位置にバンドが確認された。

(3) 次にこのゲルのバンドを切り出して In-Gel Digestion 法によりペプチドを分離した。簡単には Gel 片を2回洗浄した後、35℃で一晩トリプシン処理した。次にこのトリプシン処理サンプルを逆相 HPLC 法により精製した。精製条件は TSK gel ODS-80Ts QA (TOSOH) カラムを用いた 0.1%TFA と 0.09%TFA 90%

アセトニトリルによるグラジエント溶出である。

この結果得られた 28 kDa 蛋白質フラグメントの内部アミノ酸配列を決定した。28 kDa 蛋白質のアミノ酸配列は配列表の配列番号 3 に示した。28 kDa 蛋白質フラグメントのアミノ酸配列分析を行なうとその内部配列からヒト Apolipoprotein AI であることがわかった。

(4) そこでチップ実験に用いた同一血清検体を後の実施例 6 に述べる既知の自動分析機による免疫測定法を用いて測定し、Apolipoprotein AI 値を調べると表 1 のような結果が得られた。この免疫測定法結果より治療効果の認められた患者検体では治療後明らかに Apolipoprotein AI 値が低下していた。一方、プロテインチップ実験結果の 28 kDa 蛋白質 (Apolipoprotein AI) ピークも治療によって低くなり、治療効果を反映していた。このように免疫測定法による結果とプロテインチップ実験結果が非常によく相関し、ピークの大きさは病態解析に利用できることを示していることがわかった。

【0022】

実施例 4

7.8 kDa 蛋白質の同定

(1) WCXII プロテインチップ実験によって見出された 7.8 kDa 蛋白質についても 28 kDa タンパク質と同様に FPLC Pharmacia LKB (Amersham Pharmacia Biotech AB) にて HiTrap CM Sepharose FF カラムを用い、50 mM Ammonium Acetate バッファー、流速 2 ml/min 条件下で血清サンプルの精製を行なうと目的とする 7.8 kDa 蛋白質を精製できた。プロテインチップ実験によって 7.8 kDa 蛋白質の確認出来たフラクションを電気泳動法により確認した。検体血清は SDS を含む 2×サンプルバッファーと 1:1 の割合で混合し、90℃で 2 分間処理した後使用した。電気泳動は 15-25% Polyacrylamid Gradient Gel を用いて 10mA で行った。

(2) 図 4 のレーン 2 および 3 に示すように、クマシーブリリアントブルー染色によって 7.8 kDa の位置にバンドが確認された。この 7.8 kDa の蛋白質をほぼ単一に含むフラクションを濃縮し、先の 28 kDa 蛋白質の実施例 3 と同様に SDS-PAGE を行なってゲルから目的とする 7.8 kDa バンドを切り出して In-Gel Di

gestion 法によりペプチドを分離した。この方法は実施例 3 と同様であるが簡単には Gel 片を 2 回洗浄した後、35℃で一晩トリプシン処理する。次にこのトリプシン処理サンプルを逆相 HPLC 法により精製した。精製条件は TSK gel ODS-80Ts QA (TOSOH) カラムを用いた 0.1%TFA と 0.09%TFA 90% アセトニトリルによるグラジエント溶出である。

(3) 7.8 kDa 蛋白質フラグメントのアミノ酸配列分析を行なうとその内部配列からヒト Apolipoprotein AII であることがわかった。しかし完全長ヒト Apolipoprotein AII の理論分子量は 11432.4 であり、7.8 kDa 蛋白質はつまりヒト Apolipoprotein AII 分解産物であることがわかった。7.8 kDa 蛋白質のアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。

【0023】

実施例 5

5.9 kDa 蛋白質の同定

(1) WCXIIP 蛋白質チップ実験によって見出されたの 5.9 kDa 蛋白質について FPLC Pharmacia LKB (Amersham Pharmacia Biotech AB) にて HiTrap CM Sepharose FF カラムを用い、50 mM Ammonium Acetate バッファー、流速 2 ml/min 条件下で血清サンプルの精製を行なうと目的とする 5.9 kDa 蛋白質を精製できた。再び蛋白質チップ法により 5.9 kDa 蛋白質を多く含むフラクションをチェックした後、濃縮して HPLC (TOSOH) によって更に精製を行なった。精製条件は Sephasil protein C4 カラム (Amersham Pharmacia Biotech AB)、アセトニトリルグラジエント、1 mL/min である。

(2) 再び蛋白質チップ法によりフラクションをチェックした後、凍結乾燥により濃縮してアミノ酸配列決定を行なった。精製 5.9 kDa 蛋白質のアミノ酸配列を決定するとヒト Fibrinogen α -E Chain 分解産物であることがわかった。完全長ヒト Fibrinogen α -E Chain は分子量が 72488.3 であることから、5.9 kDa 蛋白質はヒト Fibrinogen α -E Chain 分解産物であることがわかったのである。5.9 kDa 蛋白質のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

【0024】

実施例 6

本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質と従来の肝炎マーカーとに基づくアルコール性肝障害患者の診断比較

(1) 方法

これまでに使用したのと同じアルコール性肝障害入院患者16人の入院直後、入院治療1週間経過後、入院治療後3カ月経過後の血清を用いて、従来の肝炎マーカーの測定値を求めた。自動分析機による測定は AST、GGT、TG、Apo AI 及び Apo AII については Hitachi7150 型分析機 (HITACHI) を使用して行い、試薬はそれぞれ N-アッセイ L GOT (AST) (Nittobo)、N-アッセイ L γ -GTP-H (GGT) (Nittobo)、N-アッセイ TG L (TG) (Nittobo)、N-アッセイ TIA Apo AII-H (Apo AI) (Nittobo)、N-アッセイ TIA Apo AII (Apo AII (Nittobo)、を使用した。FDP 及び FDP-E は LPIA-S500 (ダイアヤトロン) を用いて所定のパラメーターにて測定し、試薬はエルピア FDP ラテックス、エルピア FDP-E ラテックス (帝国臓器) であった。尚、プロテインチップの測定結果をピークより数値化して比較するが単位は AU (Arbitrary Units) である。

【0025】

(2) 結果

表1はアルコール性肝障害によって入院した患者の一般的な血清中の臨床検査生化学系測定マーカー (AST、GGT、TG) 値、免疫系測定マーカー (Apo AI、Apo AII、FDP、FDP-E) 値、そしてプロテインチップ法による本発明の肝臓疾患マーカー蛋白質の測定結果を示す。表1の右から2番目までの欄に (FDP-E 5,900Da および Apo AII 7,800Da)、実施例2と同様のプロテインチップを用いた方法で本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質である 5.9 kDa 蛋白質と 7.8 kDa 蛋白質を測定した時の測定値が示されている。表1の右から6番目の欄 (Apo AI) に、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質である 28 kDa 蛋白質を従来法で測定した時の測定値が示されている。

表2には健常人の血清検体における、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質である 5.9 kDa 蛋白質 (FDP-E 5,900Da) と 7.8 kDa 蛋白質 (Apo AII 7,800Da) をプロテインチップ法により測定した時の測定値が示されている。

表3は、プロテインチップ法により測定したアルコール性肝障害入院患者の5



． 9 k D a 蛋白質および 7 ． 8 k D a 蛋白質測定平均値を示す。

【 0 0 2 6 】

【表1】

アルコール性肝障害患者における断酒後の臨床検査値変化

		AST	GGT	TG	Apo A I	Apo A II	FDP	FDP-E	FDP-E	Apo A II
		U/L	U/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL	μg/mL	ng/mL	5,900Da AU	7,800Da AU
No.1	入院時	34	542	672	144	37.3	2.99	110.32	11.7	9.9
	1週間後	39	559	246	121	27.8	2.76	135.69	24.2	10.9
	3ヵ月後	25	121	142	79	17.4	1.63	80.20	20.8	6.1
No.2	入院時	13	9	103	88	15.0	3.57	77.28	0	3.1
	1週間後	30	16	98	94	15.1	3.69	136.11	1.0	11.7
	3ヵ月後	15	3	173	95	20.8	2.65	126.56	1.8	20.0
No.3	入院時	42	68	100	155	38.2	1.37	70.18	0	0
	1週間後	22	45	91	105	26.0	7.05	592.26	0	1.7
	3ヵ月後	18	19	117	104	21.5	15.96	1257.50	0.7	5.0
No.4	入院時	86	1452	150	234	45.0	3.39	93.30	0.5	7.9
	1週間後	21	701	73	112	26.1	5.24	347.94	3.5	12.6
	3ヵ月後	15	24	68	95	17.7	7.27	516.60	17.7	21.1
No.5	入院時	24	74	93	95	21.8	0.31	35.11	0.8	2.4
	1週間後	23	64	139	86	21.0	1.36	47.86	4.8	16.1
	3ヵ月後	35	160	154	80	18.5	3.27	71.87	6.2	18.1
No.6	入院時	44	108	141	149	37.7	1.56	42.53	9.2	12.1
	1週間後	25	64	117	98	26.0	3.56	248.95	48.0	21.4
	3ヵ月後	17	24	109	83	19.3	8.88	743.54	58.0	20.0
No.7	入院時	37	272	119	218	46.5	2.54	90.77	0	0
	1週間後	27	174	77	157	33.7	2.05	91.00	23.0	18.4
	3ヵ月後	19	26	81	95	23.3	1.58	50.95	21.7	10.4
No.8	入院時	40	61	170	183	33.3	3.87	127.00	1.7	3.3
	1週間後	24	57	65	113	22.7	3.17	189.23	0	5.7
	3ヵ月後	22	36	113	101	20.6	2.35	105.10	1.8	6.9
No.9	入院時	20	77	244	114	28.4	4.33	118.19	0	0.4
	1週間後	25	65	121	109	24.9	5.03	330.58	0	7.1
	3ヵ月後	24	36	260	109	24.0	5.33	270.77	1.7	14.0
No.10	入院時								2.0	5.6
	1週間後	55	232	67	69	18.5	13.52	915.69	8.7	16.1
	3ヵ月後	17	41	54	107	20.6	0.87	35.35	1.7	21.4
No.11	入院時	38	81	187	151	34.5	2.82	58.02	15.8	19.3
	1週間後	20	67	98	116	28.1	6.33	554.17	56.0	26.4
	3ヵ月後	22	18	74	104	18.1	15.51	1310.60	52.0	18.6
No.12	入院時	18	37	103	135	24.8	1.91	43.10	0	11.7
	1週間後	17	31	110	126	19.6	1.78	68.85	0.8	6.4
	3ヵ月後	21	32	118	136	22.6	1.03	33.59	1.2	15.0
No.13	入院時	18	31	84	198	30.6	1.99	38.14	12.2	9.4
	1週間後	100	23	72	154	22.7	6.74	342.92	32.8	13.9
	3ヵ月後	17	18	80	180	22.6	14.37	1118.50	45.0	15.0
No.14	入院時	63	44	333	154	39.5	3.07	96.96	0	3.1
	1週間後	43	39	72	111	27.0	2.50	146.95	0.3	11.0
	3ヵ月後	37	26	159	92	23.2	4.73	382.86	0.3	12.1
No.15	入院時	49	86	91	146	28.9	1.35	58.93	13.0	7.0
	1週間後	19	79	82	83	23.0	2.29	59.44	28.5	17.7
	3ヵ月後	22	60	112	86	22.5	2.99	177.59	51.0	18.0
No.16	入院時	29	84	90	162	31.3	3.24	88.54	2.5	1.3
	1週間後	12	70	118	102	26.6	1.86	84.94	1.7	10.3
	3ヵ月後	16	15	96	72	17.0	5.84	213.87	2.0	13.3

【0027】

【表2】

健常人における5.9kDa、7.8kDa値

健常者数(n=12)	FDP-E	Apo A II
	5.9kDa AU	7.8kDa AU
No. 1	59.1	35.1
No. 2	51.7	32.0
No. 3	62.5	42.8
No. 4	63.1	44.0
No. 5	89.2	95.4
No. 6	58.5	42.2
No. 7	64.6	45.5
No. 8	66.2	44.6
No. 9	23.1	56.9
No. 10	55.4	51.7
No. 11	63.7	52.0
No. 12	36.0	24.6

【0028】

【表3】

5.9kDa、7.8kDa平均値

	FDP-E	Apo A II
	5.9kDa AU	7.8kDa AU
健常者(n=12)	57.76	47.23
患者入院直後	4.34	6.03
患者1週間後	14.58	13.00
患者3ヶ月後	17.73	15.63
患者数(n=16)		

【0029】

表1から3に示されるように、汎用されてきたAST、GGT値の低下、正常値範囲への回復は肝治療効果を反映していた。しかしGGTノンレスポonderと思われる検体No.5にみられるように、これまで汎用されてきたGGT値が治療効果の指標になりえないケースでも、5.9kDa蛋白質および7.8kDa蛋白質は血中値が上昇し、治療効果をよく示していた。GGTは肝障害の重症度や積算飲

酒量とは必ずしも相関せず、またアルコール飲用後のGGTの変化には個体差があり、大量飲酒後にも増加しないいわゆるノンレスポonderが相当数存在するので新規蛋白質はこれらGGT ノンレスポonderの治療判定に有効であると考えられた。

【0030】

【発明の効果】

以上に具体的に示したように、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質は、GGT等の従来の肝炎マーカーが反応性の低いノンレスポonder、または肥満にともなう脂肪肝、ある種の薬剤常用者など飲酒以外の要因でGGTが高値を示す場合でも、正確に飲酒からくる肝臓疾患患者の治療判定効果を調べ状態把握を行なう指標となり得る。つまりGGTは飲酒以外にウイルス性の慢性肝障害・肥満・ある種の薬剤の連用など他の要因で上昇するために特異性が低いのに対して、この点、本発明の肝臓疾患診断用マーカー蛋白質はウイルス性肝硬変でも変動しないので特異性に期待がもてるという長所がある。また測定対象が生化学的酵素機能に依存しないペプチドであることから検体の取り扱いがよく、測定再現性が良いという特徴があることも判明した。蛋白質として検出する本発明方法は将来的にイムノクロマト、さらには紙検紙にも応用し、家庭でもテストできるようになる可能性もあり、予防医学的にみても意義が大きいと考えられる。

【0031】


【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Maker Protein for Diagnosis of Liver Disease and Diagnosis Method of Liver Disease using the Protein

<120> Nitto Boseki Kabushiki Kaisya

<130> DA-03391



<160> 3

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Ser Ser Tyr Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg
1 5 10 15
Gly Asp Ser Thr Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys Met Ala Asp Glu Ala
20 25 30
Gly Ser Glu Ala Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His
35 40 45
Ala Lys Ser Arg Pro Val
50

<210> 2

<211> 68

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Pro Cys Val Glu Ser Leu Val Ser Gln Tyr Phe Gln Thr Val Thr
1 5 10 15
Asp Tyr Gly Lys Asp Leu Met Glu Lys Val Lys Ser Pro Glu Leu Gln
20 25 30
Ala Glu Ala Lys Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro
35 40 45

Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe

50

55

60

Val Glu Leu Gly

65

<210> 3

<211> 243

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr

1

5

10

15

Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln

20

25

30

Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp

35

40

45

Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu

50

55

60

Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu

65

70

75

80

Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys

85

90

95

Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met

100

105

110

Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu

115

120

125

Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu

130

135

140

Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg
 145 150 155 160
 Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala
 165 170 175
 Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr
 180 185 190
 His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys
 195 200 205
 Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser
 210 215 220
 Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu
 225 230 235 240
 Asn Thr Gln

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、CIPHERGEN 社のプロテインチップシステムを利用し、SAXII チップを使用して測定されたアルコール性肝障害患者血清の測定結果である。ピークの高さの減少から入院時、1週間後、3ヶ月後と経時的に 28 kDa 蛋白質 (Apolipoprotein AI) が血清中から徐々に低下していることがわかる。

【図 2】

図 2 は、図 1 と同様に WCXII チップを使用して測定したアルコール性肝障害患者血清の測定結果である。入院時から治療に伴い経時的に、(1) 5.9 kDa 蛋白質、(2) 7.8 kDa 蛋白質の血中濃度が上昇している様子がわかる。

【図 3】

図 3 は、図 1 と同様に WCXII チップを使用して測定した健常人血清の測定結果である。(1) 5.9 kDa 蛋白質、(2) 7.8 kDa 蛋白質は一定の高値を示しており、図 2 と比較することにより、同蛋白質が疾患によって低下したことがわかる。



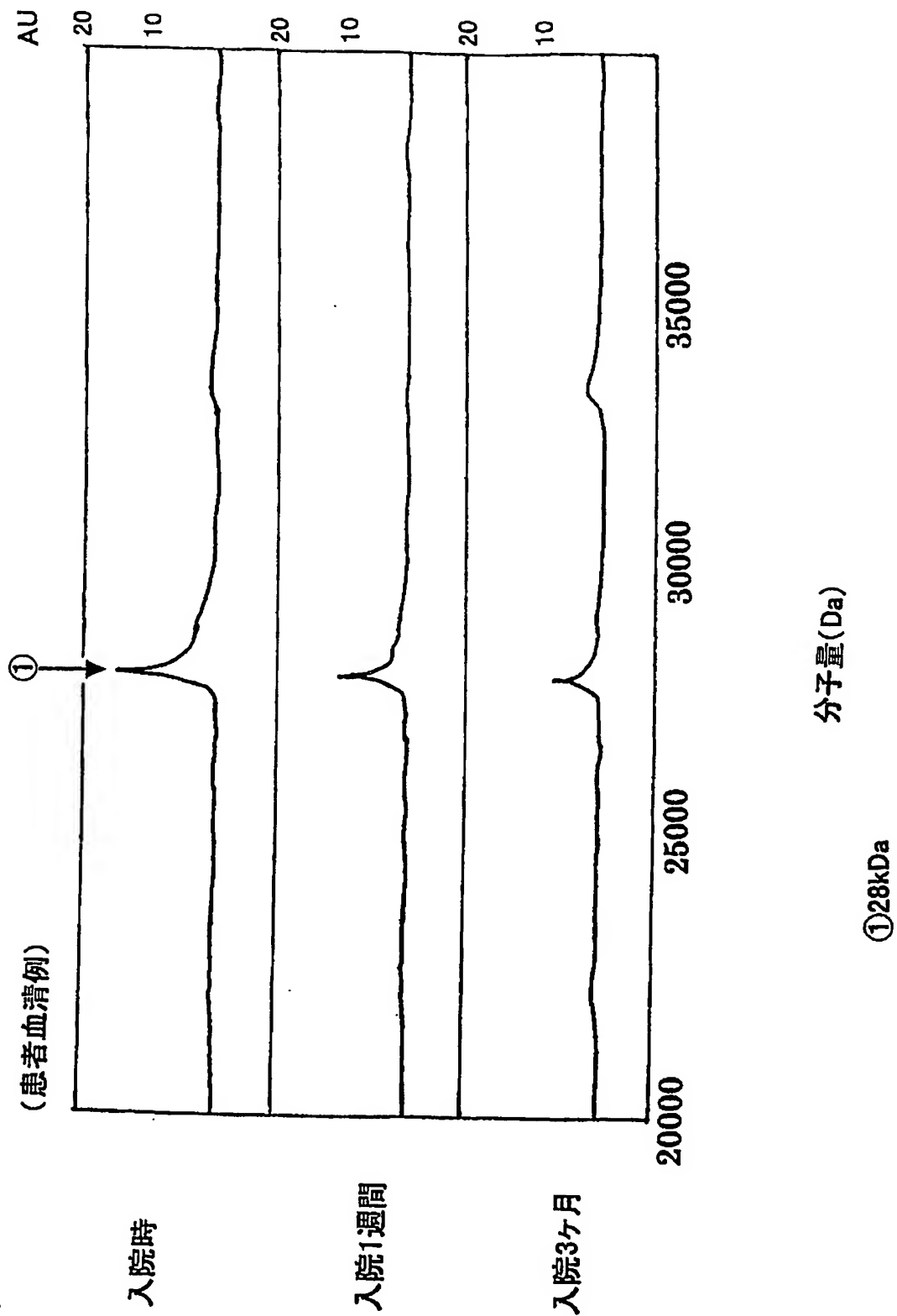
【図 4】

図 4 は、SDS-PAGE による 7. 8 k D a 蛋白質及び 2 8 k D a 蛋白質の電気泳動結果である。サンプル中に目的蛋白質を含むことがわかる。

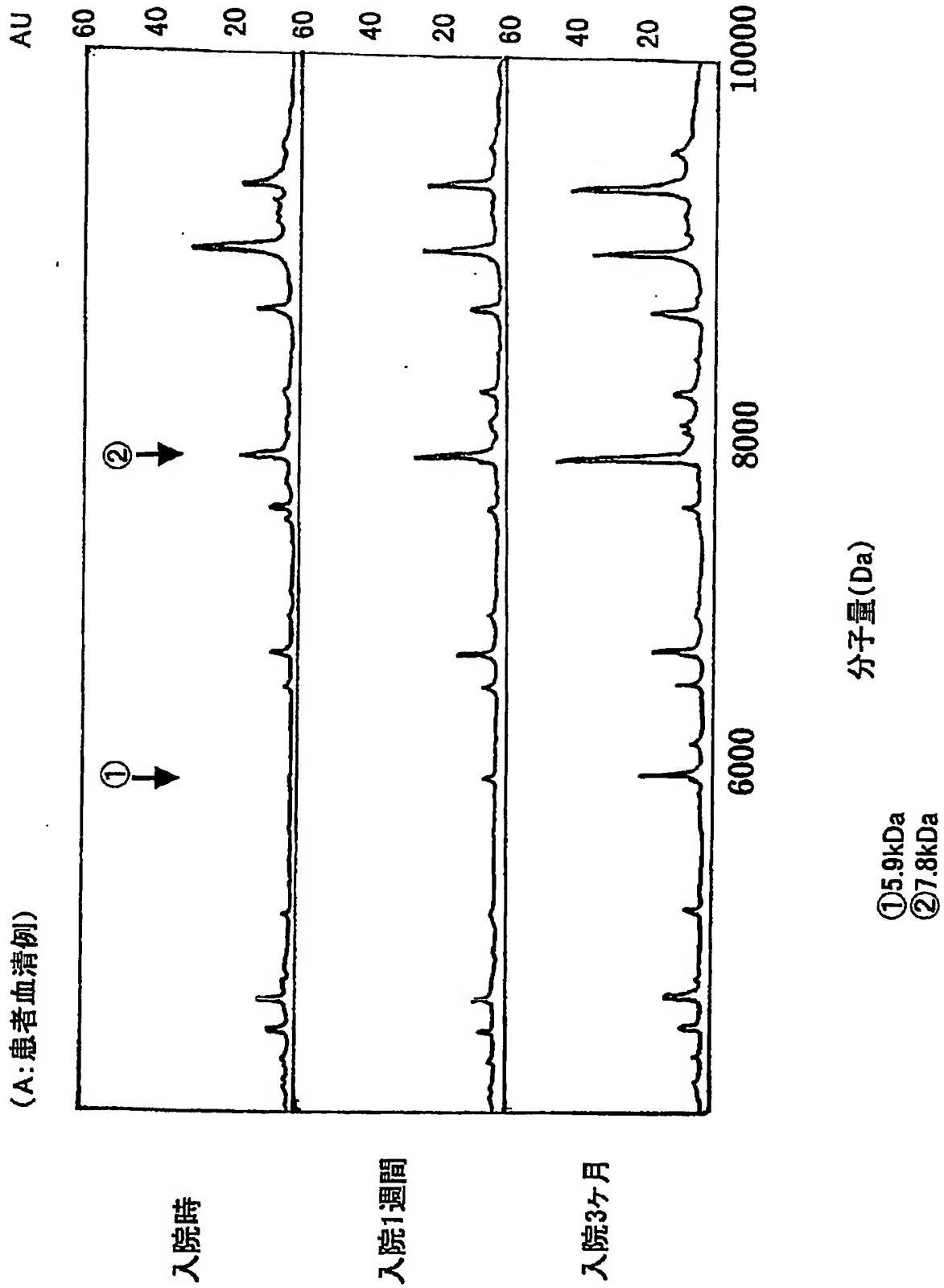
【書類名】

図面

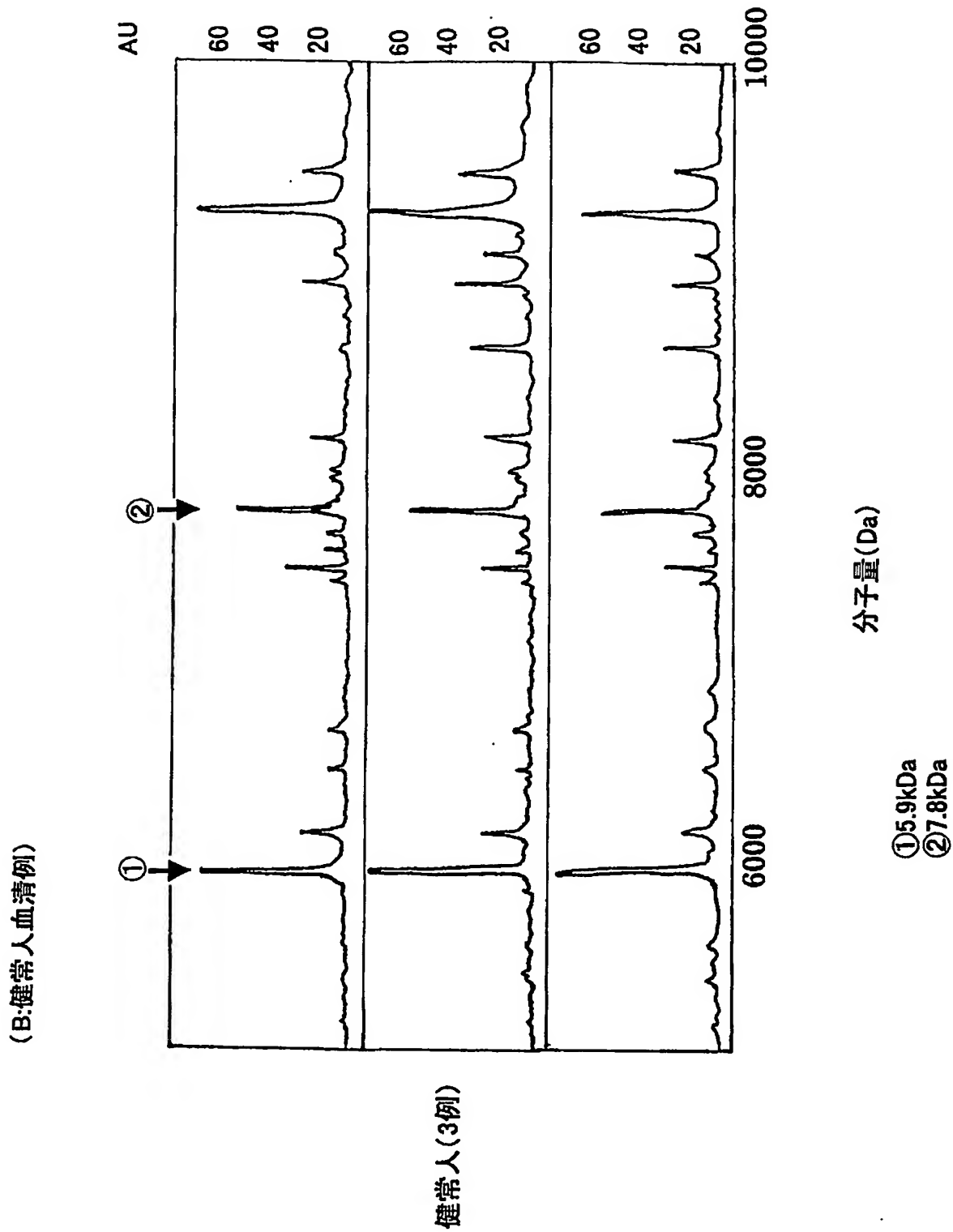
【図 1】



【図2】

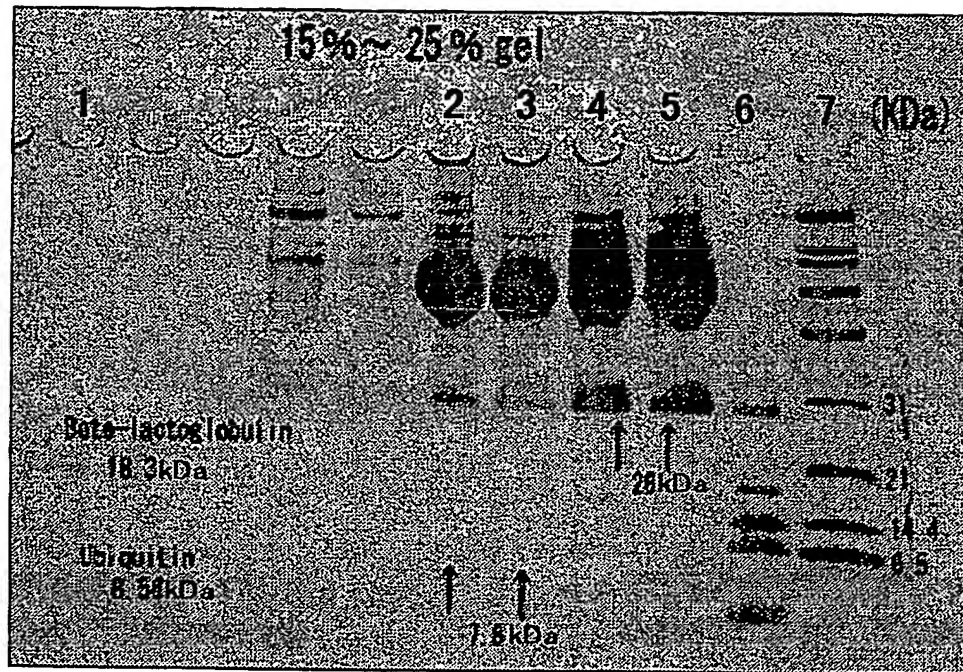


【図 3】



【図 4】

SDS-PAGE



- 1 マーカー蛋白質
- 2 血清サンプル1
- 3 血清サンプル1
- 4 血清サンプル2
- 5 血清サンプル2
- 6 低分子マーカー
- 7 高分子マーカー

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 各種肝臓疾患をおこす可能性のある習慣飲酒者・問題飲酒者を適確に診断できる肝臓疾患診断用マーカー蛋白質およびそれを利用した診断方法を提供する。

【解決手段】 プロテインチップテクノロジーを利用して血清等生体試料のプロテオーム解析を行い、習慣飲酒に伴って増減するヒトフィブリノーゲン α -E 鎖 (Fibrinogen α -E Chain) の分解産物であって分子量 5,900 の蛋白質、アポリポプロテイン AII (Apolipoprotein AII) の分解産物であって分子量 7,800 の蛋白質およびアポリポプロテイン AI (Apolipoprotein AI) であって分子量 28,000 の蛋白質を新たに見出し、これらの蛋白質の検出あるいは定量により問題飲酒者等の肝臓疾患を早期に診断することができる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 7 1 9 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 3 9 7 5]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

福島県福島市郷野目字東 1 番地

氏 名

日東紡績株式会社